

[CN 1377333 A]

Title : Process to separate 1,3-propanediol or glycerol, or a mixture thereof from a biological mixture

Application Number 00813760

Application Date 2000.10.04

Publication Number 1377333

Publication Date 2002.10.30

Priority Information

International Classification C07C29/76;C12P7/18

Applicant(s) Name E.I. Du Pont Nemours and Co.

Address

Inventor(s) Name D.R. Corbin;T. Norton

Patent Agency Code 72001

Patent Agent jiang jiancheng

Abstract

A process is provided to separate 1,3-propanediol, glycerol, or a mixture of 1,3-propanediol and glycerol from a biological mixture using a molecular sieve.

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07C 29/76

C12P 7/18

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813760.9

[43]公开日 2002 年 10 月 30 日

[11]公开号 CN 1377333A

[22]申请日 2000.10.4 [21]申请号 00813760.9

[30]优先权

[32]1999.10.5 [33]US [31]60/157,773

[32]1999.10.7 [33]US [31]60/158,204

[86]国际申请 PCT/US00/27257 2000.10.4

[87]国际公布 WO01/25178 英 2001.4.12

[85]进入国家阶段日期 2002.4.1

[71]申请人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州威尔明顿

[72]发明人 D·R·科宾

T·诺顿

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 从生物混合物中分离 1,3-丙二醇或甘油
或其混合物的方法

[57]摘要

提供了一种使用分子筛从生物混合物中分离 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油的混合物的方法。

ISSN 1000-4274

权 利 要 求 书

1. 一种从混合物中分离物质的方法，所述方法包括以下步骤：

5 (a) 使含有 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油的混合物的生物混合物与足量的至少一种沸石接触，所述沸石选自 MFI、MEL、BEA、MOR、FAU、LTL、GME、FER、MAZ、OFF、AFI、AEL 和 AET 以及拓扑结构与这些沸石相同的材料；

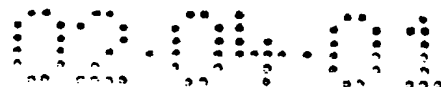
(b) 使步骤(a)的沸石与解吸剂接触，所述解吸剂选自乙醇:水溶液或任何 C_1 - C_4 醇:水溶液；

10 (c) 收集从步骤(b)的分子筛洗脱的 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油的混合物；和

(d) 任选地重复步骤(a)-(c)至少一次。

2. 权利要求 1 的方法，所述方法还包括在步骤(a)中选择第一种沸石，从所述生物混合物中选择性地吸附 1,3-丙二醇和甘油的混合物，进行步骤系列(b)、(c)和任选的(d)，然后进行以下步骤：(a)' 使 1,3-丙二醇和甘油的混合物与第二种沸石接触，以从 1,3-丙二醇和甘油的混合物中选择性地吸附 1,3-丙二醇或甘油，(b)' 使步骤(a)'的沸石与一种解吸剂接触，所述解吸剂例如为乙醇:水溶液或任何 C_1 - C_4 醇:水溶液；(c)' 收集从步骤(b)'的沸石洗脱的 1,3-丙二醇或甘油；和(d)' 20 任选地重复步骤系列(a)'-(c)'至少一次，以获得纯化的 1,3-丙二醇或甘油。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述沸石还包含选自氧化铝和二氧化硅的一种粘合剂。



说明书

从生物混合物中分离 1,3-丙二醇或甘油或其混合物的方法

5

发明领域

本发明涉及用分子筛从生物混合物中分离 1,3-丙二醇或甘油或其混合物的方法。

发明背景

10

1,3-丙二醇是在服装、地毯等方面具有多种应用的高性能聚酯-聚对苯二甲酸丙二酯(3GT)的一种重要的单体。1,3-丙二醇合成和分离的成本在 3GT 聚酯的总成本中起关键作用。

15

在文献中可找到生产 1,3-丙二醇的各种途径。这些途径包括商业上实施的化学合成途径(例如丙烯醛水合和随后的氢化)和未商业化的生物途径(例如从葡萄糖通过甘油至 1,3-丙二醇的途径)。在所有情况下, 1,3-丙二醇的合成产生在聚合之前必须除去的杂质。就丙烯醛途径而言, 这些杂质包括水、丙烯醛和其它有机化合物。同样, 从葡萄糖开始的生物途径可能有例如水、葡萄糖、有机酸、盐、甘油和其它化合物的杂质。已知 1,3-丙二醇具有高沸点和亲水性, 因此通过标准方法将 1,3-丙二醇与这些污染物和反应副产物和/或反应联产物经济地分离是困难的。

20

25

纯化 1,3-丙二醇的已知方法有严重的限制。含水 1,3-丙二醇的液液提取(Malinowski, *Biotech. Prog.* 13(2), 127-30 (1999))被公开为“不够好而不足以使简单提取有效”。另一种液-液提取(DE 86-3632397)用环己烷从 1,3-丙二醇提取二聚的丙烯醛; 然而, 该方法所需的时间超过 1 小时, 并且对于除去丙烯醛以外的杂质几乎无用。用离子排斥法或反相法经 HPLC 分离 1,3-丙二醇(Mao 等, *J. Liq. Chromatogr.* 17(8), 1811-9 (1994))是众所周知的, 但由于色谱介质和高压操作的成本仅可以小

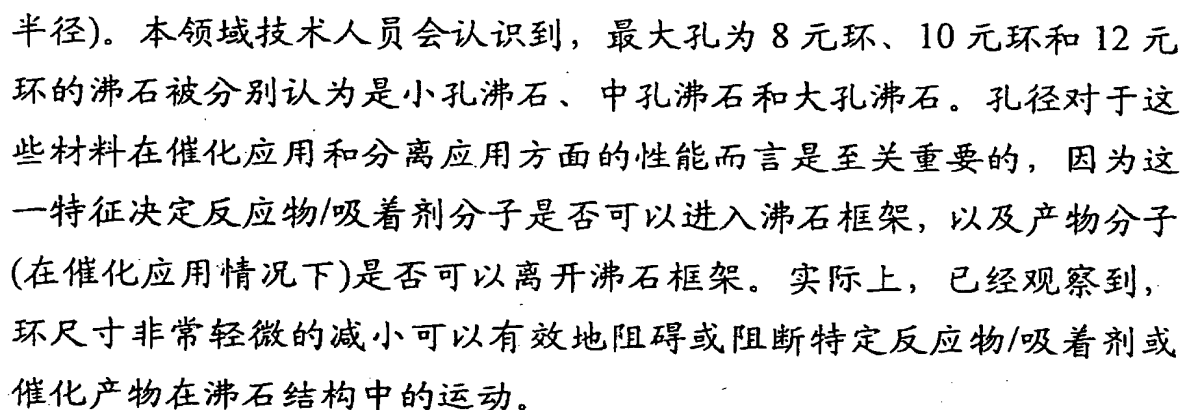
规模使用。纯化 1,3-丙二醇的一种标准技术包括将生产流(process stream)蒸发,然后蒸馏,这两者都需要非常大量的热量输入,并且可能是昂贵的。

另外,众所周知,生产 1,3-丙二醇的方法可能会受到反馈抑制;也就是说,特别是对于生物途径而言,高浓度 1,3-丙二醇的产生可以降低额外 1,3-丙二醇生产或细胞生长的速率(Cameron 等 *Biotech. Prog.* 14, 116-25 (1998))。因此,能够在 1,3-丙二醇生产期间原位使用的分离方法将有额外的价值。

已经提出将例如碳和沸石的选择性吸着剂用于 1,3-丙二醇的分离。用这类吸着剂分离的效率是随生物混合物的组分和所涉及的吸着剂而变的。基于吸着剂的系统的成功设计被认为是该分离方法中的一个重要因素。

沸石在属类上可以被描述为复合硅铝酸盐,其特征为一种封闭离子和水分子所占据空腔的三维框架结构,所有的离子和水分子都可以在沸石基质中相当自由的运动。在商业上有用的沸石中,所述框架中的水分子可以被去除或取代,而不破坏其结构。沸石可以用以下分子式表示: $M_{2/n}O \cdot Al_2O_3 \cdot xSiO_2 \cdot yH_2O$, 其中 M 是 n 价阳离子, $x \geq 2$, 而 y 是由沸石的孔隙率和水合状态决定的数字,一般为 0-8。在天然存在的沸石中, M 主要由 Na、Ca、K、Mg 和 Ba 表示,其比率一般反映出它们的大致地理化学丰度。阳离子 M 与所述结构结合松弛,因此通常可以通过常规离子交换用其它阳离子完全或部分取代。

沸石结构包括角接的四面体, Al 原子或 Si 原子位于四面体的中心,而氧原子位于角上。这样的四面体结合为一种非常确定的包含 4 元环、6 元环、8 元环、10 元环和 12 元环不同组合的重复结构。所得的结构包括规则的通道和笼,这为分离提供了一种有用的孔结构。孔径由形成沸石通道或笼的硅铝酸盐四面体的几何学确定,标称开孔对于 6 元环而言为 0.26 nm,对于 8 元环而言为 0.40 nm,对于 10 元环而言为 0.55 nm,而对于 12 元环而言为 0.74 nm (这些数值假定氧的离子



控制进入沸石内部的孔径不仅由形成所述孔开孔的四面体决定,而且也由所述孔中或其附近是否存在离子决定。例如就沸石 A 而言,位于 8 元环开孔以及 6 元环开孔中或其附近的单价离子例如 Na^+ 或 K^+ 可以限制进入。仅位于 6 元环中或其附近的二价离子例如 Ca^{2+} 增强进入。因此 KA 和 NaA 表现出有效孔开孔分别为约 0.3 nm 和 0.4 nm, 而 CaA 的有效孔开孔为 0.5 nm。

沸石是一个亚类的分子筛，最近已经考虑将分子筛用于 1,3-丙二醇的纯化。用于 1,3-丙二醇纯化的沸石不是质子形式，因此由于所述阳离子的沥滤易于污染所述混合物或吸着剂。Guenzel 等(*Chem.-Ing.-Tech.* 62(9), 748-50 (1990))在 1,3-丙二醇/水溶液的分离方面检验了脱铝 NaY 和 silicalite；他们获得的最大负荷为 0.12 g 1,3-丙二醇/g 沸石。然而，他们没有研究甘油的选择性。Schlieker 等(*Chem.-Ing.-Tech.* 64(8), 727-8 (1992))使用活性炭，但碰到昂贵的中间体甘油显著的非特异性吸附，所达到的 1,3-丙二醇发酵产率仅为 2.5 g/L hr。Schoellner 等(*J. Prakt. Chem.* 336(5), 404-7 (1994))检验了两种 X 沸石、两种 Y 沸石和一种 Na-ZSM-5 沸石。发现 Na-ZSM-5 优于 X 沸石和 Y 沸石，但又一次可能将盐沥滤到混合物流或吸着剂流中。没有讨论从沸石中回收 1,3-丙二醇的回收率。

已经用 silicalite 从稀水溶液中回收乙醇。在一个实践(Sano 等 *J. Membr. Sci.* 95(3), 221-8 (1994))中, 在不锈钢或铝载体上的 silicalite 膜与全蒸发法中一样使用, 获得相对于水而言对乙醇超过 60 的选择性。

另外, H-ZSM-5 沸石已经用作从水溶液分离亮氨酸和异亮氨酸的工具(EP 645371)。H-ZSM-5 (Si/Al=14)用来在水性混合物中将异亮氨酸与亮氨酸分离, 然后所述沸石通过与碱接触得到再生, 这种方法产生必须用昂贵的电透析法处理的废盐。亮氨酸和异亮氨酸都有具有大的胺基团和酸基团的 6 碳部分, 其分子量比仅有 3 个碳的 1,3-丙二醇大得多。Yonsel, S.等报道了所需被吸附物亮氨酸的负荷非常低, 相当于不足 0.04 g 亮氨酸/g 沸石。本领域已知由于温度的变化引起的乙醇吸附至沸石以及乙醇从沸石上解吸, 但用乙醇使沸石吸附的产物解吸的情况尚不为人所熟知。在 JP 01153058 中, 通过用沸石吸附和用乙醇解吸进行从发酵产物中分离调味料, 但这些产物具有明显不同的疏水性和结构, 因此这样一种方法在这里显然不适用。

需要改进从发酵培养液纯化 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇和甘油的混合物的方法, 特别是在产物回收率、能量损耗和反馈抑制方面的改进。在发酵反应期间能够选择性地取出 1,3-丙二醇的技术将具有巨大的实用性。预期这种技术将降低可用的 1,3-丙二醇浓度, 由此解除反馈抑制并提高 1,3-丙二醇的总产率。因此, 可能达到更高的资本产率和潜在更高的反应产量。

发明概述

申请人提供了一种用于从混合物中分离物质的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 使含有 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油的混合物的生物混合物与足量的沸石接触, 所述沸石选自 MFI、MEL、BEA、MOR、FAU、LTL、GME、FER、MAZ、OFF、AFI、AEL 和 AET 以及拓扑结构与这些沸石相同的材料; (b) 使步骤(a)的沸石与解吸剂接触, 所述解吸剂例如为乙醇:水溶液或任何 C₁-C₄ 醇:水溶液; (c) 收集从步骤(b)的沸石洗脱的 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油的混合物; 和(d) 任选地重复步骤系列(a)-(c)至少一次。另外, 该方法包括在步骤(a)中选择第一种沸石, 以从所述生物混合物中选择性地吸附 1,3-

丙二醇和甘油的混合物，并且在进行步骤系列(b)、(c)和任选的(d)之后，进行以下步骤：(a)'使1,3-丙二醇和甘油的混合物与第二种沸石接触，以从1,3-丙二醇和甘油的混合物中选择性吸附1,3-丙二醇或甘油，(b)'使步骤(a)'的沸石与一种解吸剂接触，所述解吸剂例如为乙醇：水溶液或任何C₁-C₄醇：水溶液；(c)'收集从步骤(b)'的分子筛洗脱出来的1,3-丙二醇或甘油；和(d)'任选地重复步骤系列(a)'-(c)'至少一次，以获得纯化的1,3-丙二醇或甘油。

附图简述

图1显示了从发酵培养液中沸石填充柱的1,3-丙二醇吸附以及用乙醇：水使1,3-丙二醇解吸。

图2显示了从大规模沸石柱洗脱1,3-丙二醇。

图3显示了ISPR设备设置的略图。发酵罐(1)与交叉流滤膜(2)相连，以除去细胞块。保留物(3)循环至发酵罐(1)。滤过液被送往通过沸石填充柱(5)，而用过的流体(6)被返回发酵罐(1)。对于丰余部分，使用双重细胞滤器和沸石柱。

图4显示两周期ISPR之前、期间和之后2L 1,3-丙二醇发酵的滴定度。

图5a和5b分别显示从无细胞发酵培养液分批吸附1,3-丙二醇和甘油的负荷。x轴代表沸石的类型，其Si/Al比率示于括号中。图5a和5b所用的比例尺相同。

发明详述

本发明提供一种新技术，用于使用分子筛从生物混合物中分离1,3-丙二醇、甘油或1,3-丙二醇和甘油的混合物。与其它可利用的方法相比，本发明的方法利用相对简单的设备并且易于维护。此外，该方法解决了当前可用吸附剂的高成本和产物变异性的主要问题。

按照本发明，通过使无细胞培养液与从一组分子筛选择的沸石吸

附剂在适于吸附的温度和流速下接触一段足以除去与培养液相关的杂质并且富集 1,3-丙二醇的时间，提供选择性浓缩的产物。

在需要富集的 1,3-丙二醇产物的情况下, 本发明也包括一种用于使吸附的 1,3-丙二醇解吸以提供借此富集的产物的方法。该方法基于吸附/解吸, 尤其适用于达到高产物回收率, 其中产物在乙醇中而非在水中回收, 因此相对于蒸馏而言成本较低。

在所述纯化方法中，在产物中可能存在其它杂质。最好是，不仅从发酵物中，而且从其它污染物、副产物或联产物(例如葡萄糖、甘油等)中完全选择性地取出主要化合物(例如 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油一起)。本领域技术人员会理解，这种选择性取出不是常用的。在大多数情况下，吸着剂具有除去不止一种靶化合物的能力，因此取出靶化合物的成本增加了，并且当再生所述吸附剂时，第二个纯化问题产生了。通过选择合适的分子筛并且利用被吸附 1,3-丙二醇的程序溶剂解吸，可以达到从其它培养液组分中分离 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油两者。

在该应用中，除非另有说明，否则以下缩写和定义适用：

“原位产物取出”的缩写为 ISPR。

“容积产率”是指单位时间给定体积中生产的产物质量，单位为克/(升小时)，缩写为 $\text{g}/(\text{L hr})$ 。

“滴定度”是指液相中的产物浓度，单位为克/升，缩写为 g/L。

“1,3-丙二醇”的缩写为 3G。

“ Q_{\max} ”和“ K_m ”分别指最大吸附剂负荷和 $Q_{\max}/2$ 时的被吸附物浓度的朗缪尔参数。常用的单位分别是克被吸附物/克吸附剂(g/g)和克/升(g/L)。

分子筛是本领域众所周知的，并且在 R. Szosak, *Molecular Sieves-Principles of Synthesis and Identification*, Van Nostrand Reinhold (1989)第2页中有其定义。涉及沸石结构和特征的其它有用的一般参考文献包括以下参考文献：Meier 等, *Atlas of Zeolite Structure Types*

(International Zeolite Assn. 1978); Mumpton, "Natural Zeolites" 载于 Mineralogy 14:1 (1977) 中的综述; Smith, "Origin and Structure of Zeolites" 载于 Zeolite Chemistry and Catalysis, ACS Monograph 171 (American Chemical Society, (1976); Breck, "Zeolite Molecular Sieves" (Wiley, 1974); Dyer, "An Introduction to Zeolite Molecular Sieves" (John Wiley & Sons, 1988); Szostak, "Handbook of Molecular Sieves" (Van Nostrand Reinhold, 1992).

用于本发明方法的一类沸石种类是中孔合成沸石, 其合成时的 (as-synthesized) 形式可以用以下分子式描述: 对于 ZSM-5 为 $(\text{Na}, \text{TPA})_n[\text{Al}_n\text{Si}_{96-n}\text{O}_{192}] \sim 16 \text{ H}_2\text{O}$, 对于 ZSM-11 为 $(\text{Na}, \text{TBA})_n[\text{Al}_n\text{Si}_{96-n}\text{O}_{192}] \sim 16 \text{ H}_2\text{O}$, 其中 TPA 和 TBA 分别为四丙基铵阳离子和四丁基铵阳离子。这些合成沸石的结构和合成是相关领域众所周知的。然后通过本领域众所周知的标准方法将这些沸石转变为氢型 (Donald W. Breck; Zeolite Molecular Sieves; 参见上文)。当沸石中的平衡离子为 H^+ 时, 则所述框架是固体酸, 它由于将酸质子限制在沸石孔体系结构中, 可以表现出形状选择性催化特性或吸附特性。H-ZSM-5 的平均孔径为 5.5 埃。

在一个实施方案中, 本发明用 H-ZSM-5 来从无细胞培养液中分离 1,3-丙二醇。此外, 用乙醇/水将 1,3-丙二醇从 ZSM-5 沸石上解吸。出乎意外的是, 被吸附的 1,3-丙二醇被所述乙醇/水混合物取代。并且通过提高乙醇的浓度增加了 1,3-丙二醇的产量, 这表明用富含乙醇的混合物洗脱 1,3-丙二醇的客观需要。经计算 1,3-丙二醇产物的总回收率高达 94.7%。虽然本发明利用乙醇来洗脱被吸附的 1,3-丙二醇, 但融合 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 醇都在本发明的范围之内。1,3-丙二醇的解吸在室温下进行。然而, 预期室温和 80°C 之间的温度将产生所述的有用效应。

在一个可供选择的实施方案中, 通过为所述柱供给浓度增加的乙醇, 达到两级程序解吸。第一个低浓度导致洗脱下不需要的化合物, 而第二个较高浓度主要洗脱 1,3-丙二醇。这种方法降低了其它组分对

1,3-丙二醇的污染水平。

在一个优选实施方案中，为发酵罐(1)装备一个培养液循环回路，这包括一个交叉流过滤装置(2)和一个填充 H-ZSM-5 的柱(5)，用于从发酵液中原位取出 1,3-丙二醇。将能够由葡萄糖生产 1,3-丙二醇的大肠杆菌接种物加入发酵罐(1)中。该设置允许从发酵罐(1)中取出培养液，让生物催化细胞返回至发酵罐，同时使无细胞培养液通过沸石柱(5)，以取出 1,3-丙二醇。所述培养液最终返回发酵罐(图 3)。该程序进行两个 ISPR 周期，这将产率提高至整个运行的最高产率。这一结果证明了 ISPR 的积极效应。就使用发酵培养液而言，在培养液与分子筛接触之前，用交叉流过滤来除去细胞。也可以使用其它固液分离方法，例如离心、死端过滤或切向流过滤。

在一个可供选择的实施方案中，用沸石 H-ZSM-5 ($\text{Si}/\text{Al}=140$) 从无细胞发酵液中分批取出 1,3-丙二醇。所表现出的 1,3-丙二醇吸附值 (0.132 g/g) 超过了本领域所得数值(例如 Schollner 等) 33% 或更多；理论负荷(根据朗穆尔拟合, 为 $0.17 \text{ g/g } Q_{\text{max}}$) 超过本领域所得理论负荷 80% 或更多。大得多的负荷意味着需要较少的沸石材料，因此对于同一工艺而言，将需要较少的吸附剂和基建费用。或者，可以使用等量的沸石，而需要较少的解吸循环和使用较少溶剂，这将进一步降低操作费用。

在另一实施方案中，检查了许多分子筛的 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇和甘油的负荷能力。令人惊奇的是，例如 H-ZSM-5 沸石 ($\text{Si}/\text{Al}=140$) 和 H-ZSM-5 沸石 ($\text{Si}/\text{Al}=150$) 的分子筛具有两个最高总负荷，发现对 1,3-丙二醇和甘油的相对选择性取决于分子筛的选择。

在另一实施方案中，利用 H-ZSM-5 沸石 ($\text{Si}/\text{Al}=500$) 或 H-ZSM-5 沸石 ($\text{Si}/\text{Al}=15$)，从发酵培养液中同时取出 1,3-丙二醇和甘油，所述沸石中的任一个的总负荷高并且对 1,3-丙二醇:甘油的选择性接近一致。然后用如上所述的梯度洗脱，分离所得的 1,3-丙二醇/甘油混合物。也可以用常规分离方法例如蒸馏，对混合物进行进一步的纯化。

在再一实施方案中，用对 1,3-丙二醇/甘油具有高选择性的分子筛，如上所述从发酵培养液中取出 1,3-丙二醇/甘油，然后用具有高甘油负荷的分子筛(例如 H-ZSM-5 沸石，Si/Al-15)处理发酵培养液，以取出有价值的甘油组分。或者顺序或者平行回收 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油的混合物的上述方法的组合属于本发明的范围。

此外，发现在分离步骤中使用任何上述分子筛和在洗脱步骤中使用乙醇，达到的收率大于 90%。选择 H-ZSM-5 (一种特定形式的 MFI) 用于该纯化方法；然而，本领域技术人员会认识到，多种沸石是适用的。用于本发明目的其它沸石可以选自：MFI、MEL、BEA、MOR、FAU、LTL、GME、FER、MAZ、OFF、AFI、AEL 和 AET 以及拓扑结构与这些特定沸石相同的材料。优选的结构包括 FAU、MFI、MEL 和 BEA。这些分子筛是本领域众所周知的，并且由 W. M. Meier 等描述(Atlas of Zeolite Structure Types, 第 4 版, 参见上文)。这些分子筛的实例可以包括但不限于具有高 Si/Al 比(例如 ≥ 5)、表现出特定沸石框架的酸性、疏水性、孔径和其它特征的沸石。选择性可以通过物理处理(例如干燥和/或化学处理，例如用涂覆将分子筛改型)得以进一步改进。具体地说，包括沸石在内的分子筛的涂覆可以用以下方式来完成：(1) 将所述分子筛样品暴露于周围环境，并且浸入原硅酸四乙酯(TEOS)中达 2 小时之久；(2) 将该样品过滤，并于室温干燥过夜；(3) 然后将样品在流动氮气中于 550℃加热 3 小时。前述处理可以用含有选自硅、铝、硼和磷的至少一种元素的一种或多种化合物来进行，以基本上在所述分子筛的外表面沉积至少 0.05%(重量)的所述元素。也可以在未列出的分子筛上进行所述涂覆，这可以产生用于本发明目的的吸附剂。分子筛形式可以包括但不限于粉末、挤出物、颗粒、部分或完整的膜等的形式。

还发现二氧化硅粘合剂对于本发明使用的长期水性暴露更加稳定。

与已知分离方法相比时，用上述分子筛分离 1,3-丙二醇、甘油或

1,3-丙二醇与甘油的混合物,利用相对简单的设备,并且提供容易的维护。正如由下文所见,孔径比上述孔径小得多的沸石具有非常不同的吸附特性,将不能选择性地吸附 1,3-丙二醇。

概括而言,本发明用特定的分子筛,从污染物、副产物和联产物的混合物中选择性地分离 1,3-丙二醇、甘油或 1,3-丙二醇与甘油的混合物。在所述分离期间用特定解吸剂还可将其进一步浓缩。还可将后继的蒸馏和纯化的成本最小化。

在以下实施例中进一步限定的本发明。应该理解,这些实施例表明本发明的优选实施方案,给出这些实施例仅用于说明。根据上述讨论和这些实施例,本领域的专业人员可以确定本发明的必要特征,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,可以对本发明作出各种改变和修改,以使其适应于各种用途和条件。

实施例

通用方法

适用于细菌培养物维持和生长的材料和方法是本领域众所周知的。可以找到适用于以下实施例的技术,如叙述于 *Manual of Methods for General Bacteriology*; hillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg 和 G. Briggs Phillips 编著, American Society for Microbiology: Washington, DC (1994) 或 *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*; Brock, T. D., 第 2 版; Sinauer Associates: Sunderland, Massachusettes (1989)。用于细菌细胞生长和维持的所有试剂、限制性酶和材料得自 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)、DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD) 或 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), 除非另有说明。

缩写的含义如下: “sec” 是指秒, “min” 是指分钟, “h” 是指小时, “d” 是指天, “ μ L” 是指微升, “mL” 是指毫升, “L” 是指

升, “mM”是指毫摩尔浓度, “M”是指摩尔浓度, “mmol”是毫摩尔, “g”是指克, “μg”是指微克, 而“ng”是指毫微克, “v:v”是指体积/体积。

5 鉴定 3G 和甘油以及测定 3G 和甘油的浓度:

可以通过将培养基进行高压液相色谱(HPLC)分析, 直接鉴定 1,3-丙二醇和甘油。在本发明中优选其中在分析型离子交换柱上用 0.01 N 硫酸的流动相以等度方式分析发酵培养基的方法。在所有实施例中, 3G 的浓度都通过 HPLC 或 GC 测定。

10 为 Waters 717 自动取样器、Waters 温度控制组件(T=50℃)、Waters 410 示差折光计和 Waters 486 吸附监测器(λ=210 nm)配备 Shodex HPLC 柱(SH1011 sugar 柱, 300 mm x 8 mm)用于 1,3-丙二醇的定量。流动相为 0.005M H₂SO₄, 等度流速为 0.5 ml/min。用新戊酸作为内标。在这些条件下, 1,3-丙二醇和甘油分别在 26.7 分钟和 21.2 分钟时洗脱。

15 通过 GC/MS 证实 1,3-丙二醇的产生。用 GC/MS 领域技术人员可获得的的标准技术和材料进行分析。使用一种利用配有 HP Innnowax 聚乙二醇柱(HP19091N-133, 30 m x 250 mm x 0.25 mm)的 Hewlett Packard (HP) 6890 GC 的合适方法进行 1,3-丙二醇的定量。用火焰离子化检测器进行检测。烘箱的温度分布型是 t=0 时 100℃、线性升温至 t=3 分钟时升温至 250℃、于 250℃保持直至 t=5 分钟。氮流速是 2 ml/min。样品注射体积是 1 ml。在这些条件下, 1,3-丙二醇和甘油分别于 2.5 分钟和 3.65 分钟时洗脱。

20 培养基和碳底物:

25 在以下描述的所有发酵中均使用大肠杆菌菌株 FM5 pAH48/pDT29。

本发明中的发酵培养基必须含有合适的碳底物。合适的底物可以包括但不限于单糖(例如葡萄糖和果糖)、寡糖(例如乳糖或蔗糖)、多糖

(例如淀粉或纤维素或其混合物)和得自可更新饲料的未经纯化的混合物(例如干酪乳清渗透液、玉米浆、甜菜糖蜜和大麦芽)。另外,糖底物也可以是一碳底物,例如二氧化碳或已经证明其代谢转化为关键生化中间体的甲醇。已经报道了在甲基营养酵母(Yamada 等, *Agric. Biol. Chem.* 53(2), 541-543 (1989))和细菌(Hunter 等, *Biochemistry* 24, 4148-4155 (1985))中从一碳源(例如甲醇、甲醛或甲酸)产生甘油。这些生物可以同化一碳化合物,其范围从氧化态的甲烷至甲酸,并且产生甘油。糖同化途径可以通过核酮糖一磷酸的途径、通过丝氨酸的途径或通过木酮糖一磷酸的途径(Gottschalk, *Bacterial Metabolism*, 第二版, Springer-Verlag: New York (1986))。核酮糖一磷酸途径涉及甲酸与核酮糖-5-磷酸缩合形成6 碳糖,所述6 碳糖变为果糖,并最终变为3 碳产物甘油醛-3-磷酸。同样,丝氨酸途径将一碳化合物通过亚甲基四氢叶酸同化到糖酵解途径中。

除一碳和二碳底物外,也已知甲基营养生物利用多种其它含碳化合物,例如甲胺、葡糖胺和多种氨基酸进行代谢活动。例如,已知甲基营养酵母利用得自甲胺的碳生成海藻糖或甘油(Bellion 等, *Micro. Growth C1 Compd. [Int. Symp.]*, 7th, 415-32 (1993). Editor(s): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: Intercept, Andover, UK)。同样,念珠菌属(*Candida*)的各种菌种将代谢丙氨酸或油酸(Suler 等, *Arch. Microbiol.* 153(5), 485-9 (1990))。因此,考虑本发明所用的碳源可以包括各种各样的含碳底物,并且仅受生物选择的限制。

虽然考虑了所有上述碳底物及其混合物都适用于本发明,但优选的碳底物是葡萄糖、果糖、蔗糖或甲醇。

除合适的碳源外,发酵培养基还必须含有本领域技术人员已知、适用于培养物的生长和促进 1,3-丙二醇生产所必需的酶途径的合适的矿物质、盐、辅因子、缓冲液和其它组分。特别注意 Co(II)盐和/或维生素 B₁₂ 或其前体。

培养条件:

通常,细胞在合适的培养基中于 30℃ 生长。本发明中优选的生长培养基是常用的商业上制备的培养基,例如 Luria Bertani (LB)培养液、Sabouraud Dextrose (SD)培养液或酵母培养基(YM)培养液。其它成分确定的或合成的生长培养基也可以使用,微生物学或发酵科学领域技术人员将知道用于特定微生物生长的合适的培养基。已知直接或间接调节分解代谢物阻抑的试剂(例如环腺苷 2':3'-一磷酸)的应用,也可以加入到反应介质中。同样,已知调节导致 1,3-丙二醇生产增强的酶活性的试剂(例如甲基紫精)的应用,也可以与遗传操作结合使用,或作为遗传操作的替代方法。

合适的发酵 pH 范围在 pH 5.0 至 pH 9.0 之间,其中 pH 6.0 至 pH 8.0 优选作为初始条件。

反应可以在需氧条件或缺氧条件下进行,其中优选缺氧条件或微需氧条件。

分批发酵和连续发酵:

本发明方法利用分批发酵法。经典分批发酵是一密闭系统,其中培养基的组成在发酵开始时设定,并且在发酵期间不经人工改变。因此,发酵开始时用一种或多种所需生物接种培养基,然后让发酵发生,而不将培养基进一步添加到该系统中。然而,通常“分批”发酵就碳源的添加而言是分批的,通常在控制因素例如 pH 和氧浓度上进行试验。在分批系统中,该系统的代谢物和生物质组成一直在改变,直至终止发酵时。在分批培养中,细胞通过静止延滞期调节至快速生长对数期,并最终至静止期,在静止期中生长速率减小或停止。如果不经处理,则静止期的细胞将最终死亡。对数期的细胞一般导致终产物或中间体的大量产生。

标准分批系统的一种变体是补料分批系统。补料分批发酵法也适用于本发明,包括一个典型的分批系统,只是随发酵进程以增量添加

底物。当分解代谢物阻抑易于抑制细胞代谢时，以及在理想的在培养基中具有有限量的底物的情况下，补料分批系统是有用的。难以对补料分批系统中底物浓度进行测量，因此根据可测量因素例如 pH、溶解氧和废气例如 CO₂ 的分压的改变来估计。分批发酵和补料分批发酵是常用的，是本领域众所周知的，可以在 Brock (参见上文) 中找到其实例。

虽然本发明以分批模式进行，但考虑到该方法将适用于连续发酵法。连续发酵是一开发系统，其中向生物反应器中连续添加确定的发酵培养基，同时取出等量的条件培养基进行加工。连续发酵一般将培养物维持在恒定的高密度，其中细胞主要处于对数期生长。

连续发酵便于对影响细胞生长或终产物浓度的一种因素或任何数目因素进行调节。例如，一种方法将有限营养物(例如碳源或氮)水平维持在固定比率，并且允许调节所有其它参数。在其它系统中，可以连续改变影响生长的多种因素，而将通过培养基浊度测量的细胞浓度保持恒定。连续系统努力维持稳态生长条件，因此必须使由于培养基被取出所致的细胞损失与发酵中的细胞生长速率相平衡。调节连续发酵法的营养物和生长因素的方法以及使产物生成速率最大化的技术是工业微生物学领域众所周知的，Brock (参见上文) 详述了多种方法。

考虑了本发明可以采用分批法、补料分批法或连续法实施，任何已知的发酵模式都将是适用的。另外，考虑了可以将细胞固定化在基质上作为全细胞催化剂，然后经受 1,3-丙二醇生产的条件。

细胞:

适用于本发明的细胞包括含脱水酶的那些细胞。通常所述酶是分别对或者甘油或者 1,2-丙二醇具有底物特异性的或者甘油脱水酶或者二醇脱水酶。脱水酶能够将甘油转化为羟基丙醛(3-HPA)，然后 3-HPA 被转化为 1,3-丙二醇。含有这一途径的细胞可以包括属于以下属的突变生物或重组生物：柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、沙门

氏菌属(*Samonella*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)。本领域技术人员已知通过发酵产生甘油的微生物例如曲霉属(*Aspergillus*)、酵母属(*Saccharomyces*)、接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、*Dunaliella*、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)、毛霉属(*Mucor*)、*Toryloopsis* 和甲基杆菌属(*Methylobacteria*)，可以是重组脱水酶的宿主。适合用作本发明宿主的其它细胞包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。相信属于适用于本发明的上述类群的生物存在于自然界中。

用作分子筛的沸石可以得自不同的厂商，包括 Zeolyst (以前称为 PQ) (Valley Forge, PA)、Süd-Chemie (德国)、UOP (Des Planies, IL)、Uetikon (瑞士)。

实施例 1

通过柱吸附/解吸选择性浓缩 1,3-丙二醇

将 23 g H-ZSM-5 (~75% H^+ , 25% Na^+ 阳离子平衡; Si:Al=25; 70%沸石, 30%氧化铝粘合剂)挤出物(直径 1/8 英寸)填充到 Amicon 柱 (Millipore Coporation, Bedford, MA) (40 ml 柱体积, ~1" ID)中, 以 0.8 ml/min 泵送无细胞培养液(47 g/L 1,3-丙二醇)通过该柱。该流速持续直至观察到 1,3-丙二醇突破该柱(即当 1,3-丙二醇的出口浓度等于入口浓度时($t=90$ min))。在 $t=120$ min 时, 以 0.8 ml/min 泵送 50:50 (v:v)乙醇:水通过该柱, 以洗脱被吸附的 1,3-丙二醇产物(图 1)。

被吸附的 1,3-丙二醇的质量是 2.10 g, 被解吸的 1,3-丙二醇的质量是 1.99 g; 计算的产物回收率是 94.7%。

02-04-01

5

10

从发酵培养液原位取出 1,3-丙二醇

25

进一步增大超过 5 g/L hr. 所生产的 1,3-丙二醇的总浓度(包括所吸附的量)超过 60 g/L。这一数值表示比基线情况(36 h 时为 30 g/L)增加 100%。总容积产率(g/L h)与基线情况相比增加 40%。通过最终 OD 测量, 37 小时后发生 1,3-丙二醇的额外生产时, 几乎没有细胞的生长(图 4)。

实施例 4

从无细胞发酵培养液分批取出 1,3-丙二醇

测试 H-ZSM-5 (Si/Al=140; wr % Na₂O=0.02; 0.5 μm 的微晶)从无细胞发酵培养液吸附 1,3-丙二醇的情况。在搅拌(200 rpm)下, 使沸石于室温(标称 22℃)分批接触。然后抽取液体样品用于 1,3-丙二醇和甘油的定量。

| [3G]初始 g/L | [3G]平衡 g/L | [gly]初始 g/L | [gly]平衡 g/L | 3G 荷载 g/g | 甘油荷载 g/g | 选择性 (3G/gly) |
|---------------|---------------|----------------|----------------|--------------|-------------|-----------------|
| 83.16 | 68.15 | 6.86 | 6.69 | 0.132 | 0.002 | 83.860 |
| 41.58 | 30.14 | 3.43 | 1.00 | 0.115 | 0.025 | 4.705 |
| 20.79 | 13.39 | 1.72 | 0.00 | 0.073 | 0.017 | 4.311 |
| 8.316 | 5.53 | 0.69 | 0.00 | 0.026 | 0.007 | 4.053 |

达到了证明高于 0.13 g 1,3-丙二醇/g 沸石的负荷。通过对所述数据进行朗穆尔拟合, 计算出最大理论负荷为 0.178 g/g ($r^2=0.996$), 而 K_m 为 20.4 g/L 3G。

实施例 5

从发酵培养液分批吸附 1,3-丙二醇和甘油

通过使无细胞发酵培养液与分子筛或沸石接触, 分批测定平衡吸附负荷。在搅拌(200 rpm)下, 使吸附剂于室温(标称 22℃)分批接触 24 小时。然后抽取液体样品用于 1,3-丙二醇和甘油的定量。

如图 5a 所示, H-ZSM-5 (Si/Al=140) (在实施例 4 中进一步限定)不仅在 1,3-丙二醇和甘油总负荷(0.0179 g/g 总负荷)方面给出所检验沸

石中的最佳性能，而且在对 1,3-丙二醇选择性方法也表现出最佳性能 (2.82:1 1,3-丙二醇:甘油)。

如图 5b 所示，也检验了 CMS 分子筛(市售的分子筛)和 H-Beta 沸石。CMS 是一种小孔碳分子筛，没有给出可检测的负荷；H-Beta 是一种大孔沸石，给出中等负荷(0.083 g/g 总负荷)和良好的选择性(3.88:1 1,3-丙二醇:甘油)。

实施例 6

在水性环境中较长期的沸石操作

将所述沸石与粘合剂一起用于增强填充床操作中的机械强度。在乙酸纤维素滤膜真空过滤之前，在搅拌(200 rpm)下，分批测量 24 小时内沸石-粘合剂的质量。根据滤膜上残留的沸石的干重，测量最终的沸石质量。结果表明，氧化铝粘合剂的溶解比二氧化硅容易得多 (1300%)，并且表明二氧化硅粘合剂优选用于水性环境中的长期操作。

| 沸石 | 挤出物粘合剂 | 初始沸石, g | 最终沸石, g | 沸石质量损失百分比 |
|---------------|--------|---------|---------|-----------|
| H-ZSM-5 (I) | 氧化铝 | 2.641 | 2.2981 | 12.98 |
| H-ZSM-5 (II) | 二氧化硅 | 2.667 | 2.6406 | 0.99 |
| NaZSM-5 (III) | 氧化铝 | 2.67 | 2.3264 | 12.87 |

所述沸石的描述如下: H-ZSM-5 (I) (在加入 Al 粘合剂后 Si/Al=14.8; %Na=0.08%), H-ZSM-5 (II) (二氧化硅粘合剂); NaZSM-5 (III) (Si/Al=15), 通过与 2 L 10% NaNO₃ 水溶液于 90℃ 接触 3 次，每次 1 小时而形成的。如下将其将所得材料在空气中煅烧: 将温度以 60℃/小时的速度升至 500℃，在 500℃ 保持 10 分钟，然后再次将温度以 60℃/小时的速度升至 550℃，在 550℃ 保持 5 小时，冷却至 110℃，然后将所得材料置于干燥小瓶中并将其密封。

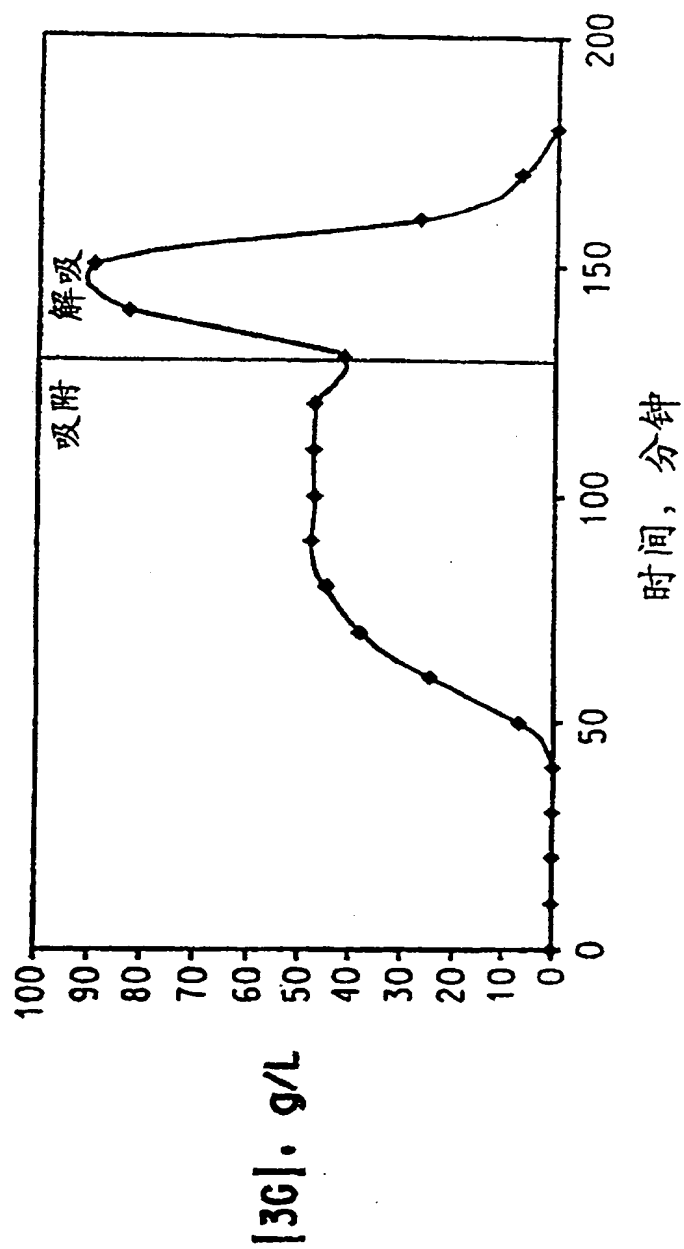


图 1

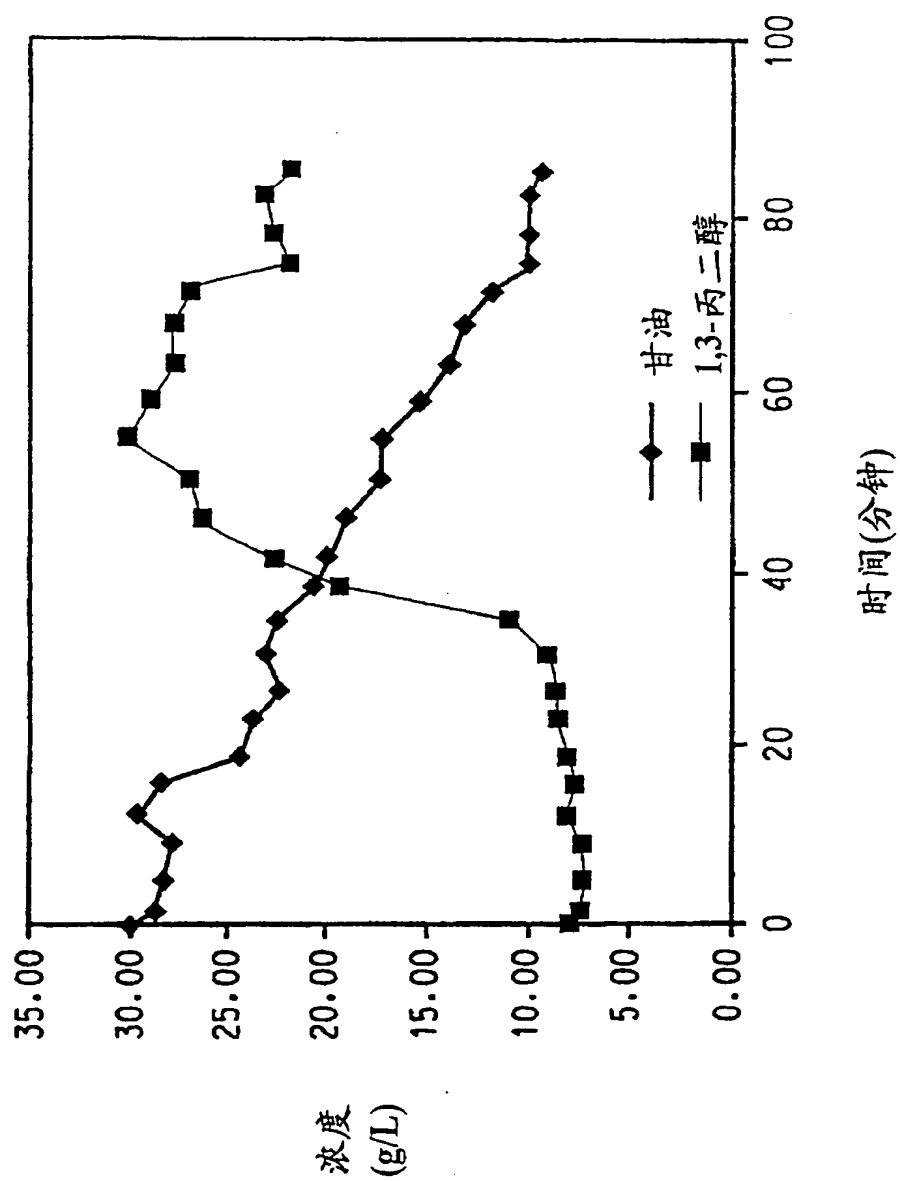


图 2

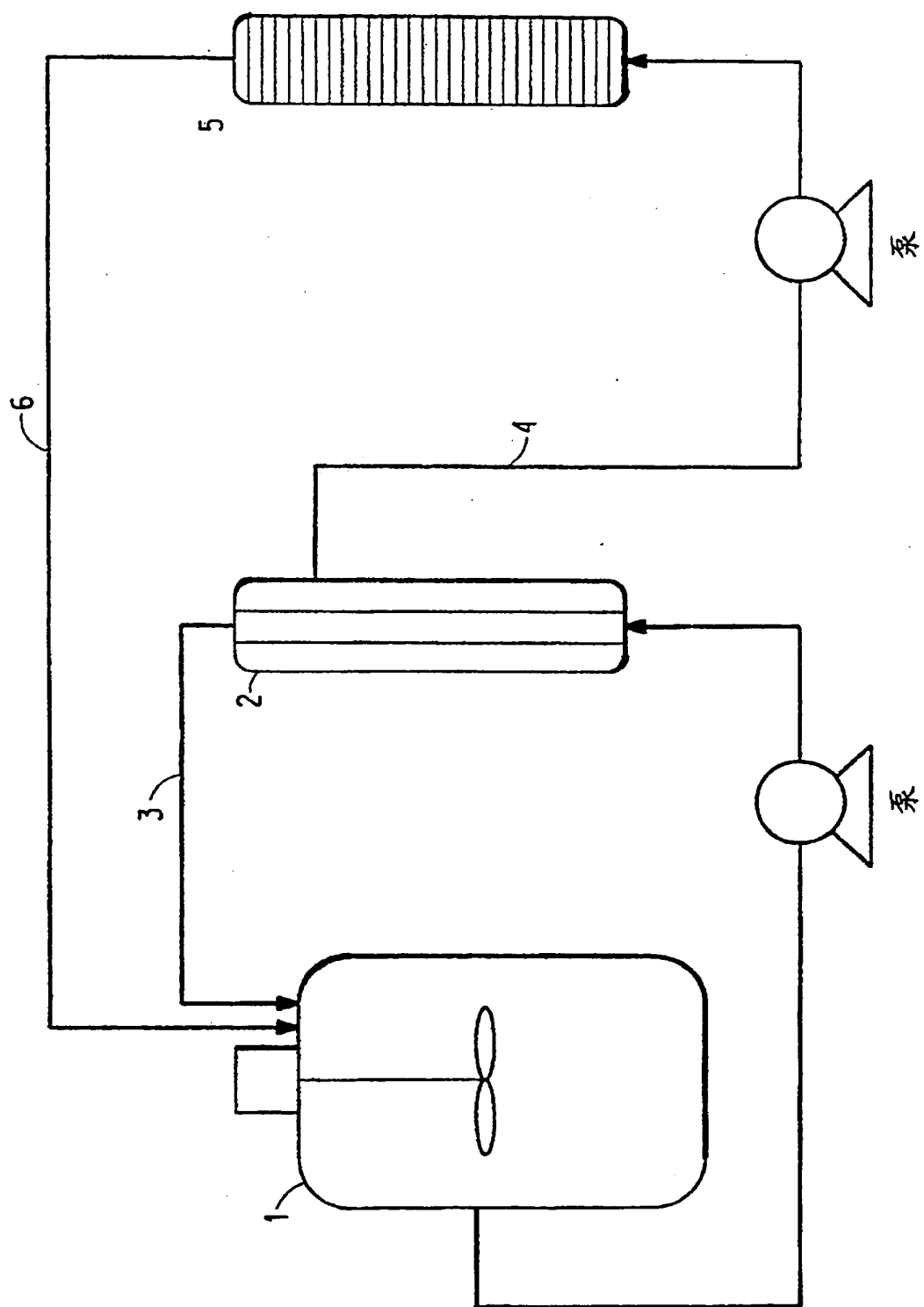


图 3

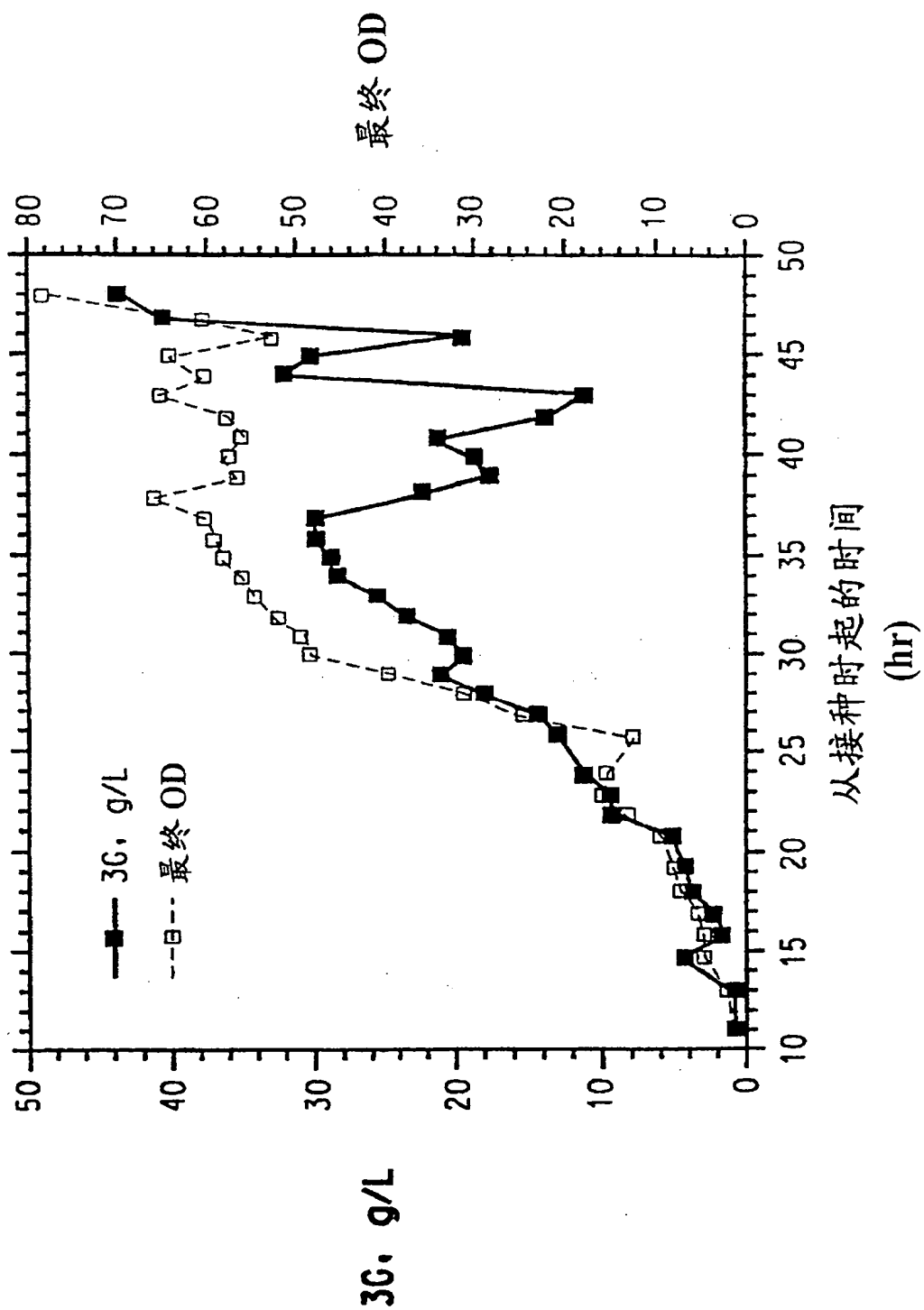


图 4

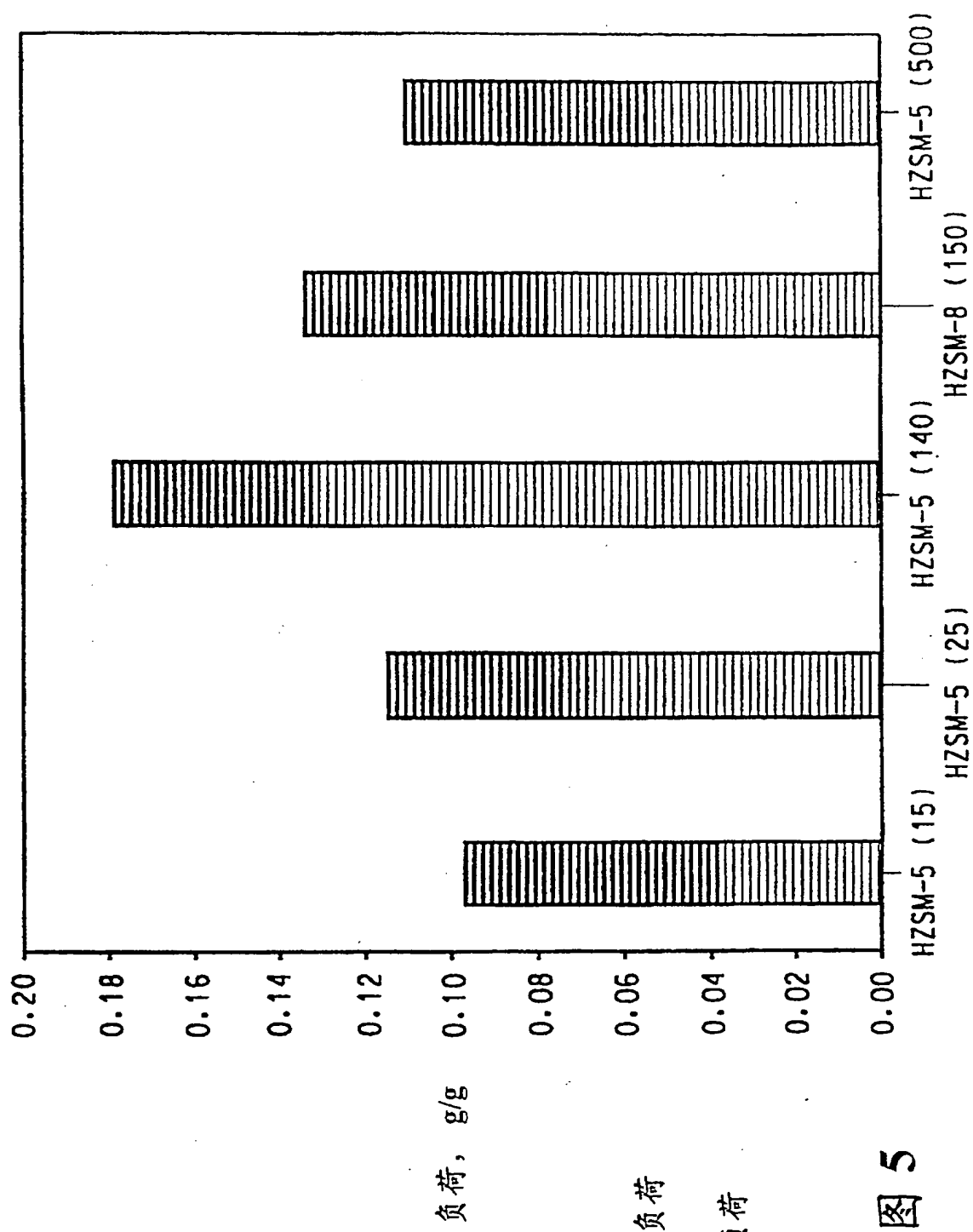


图 5

甘油负荷
3G 负荷

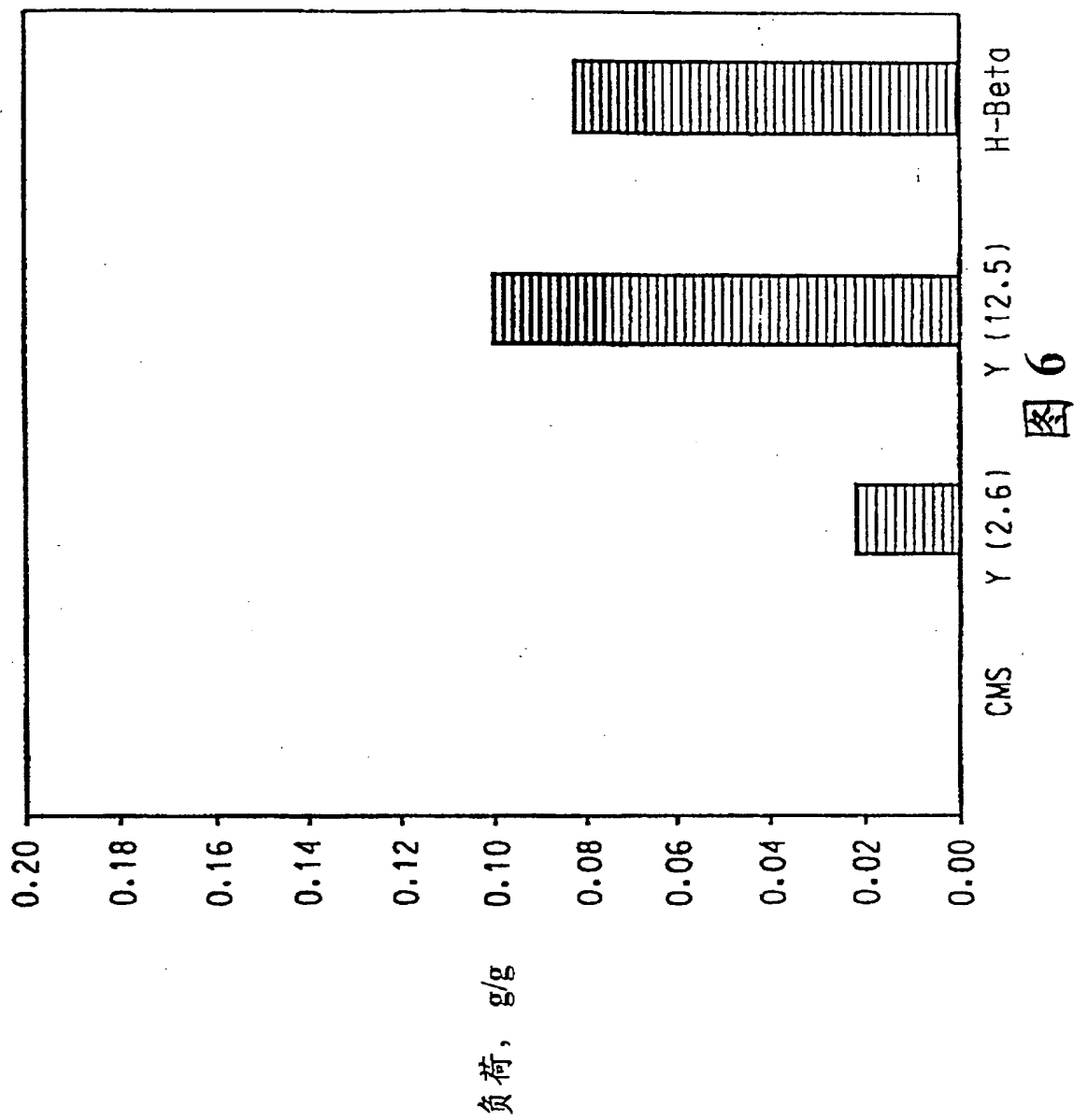


图 6